

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

3

(11)Publication number : 63-056277

(43)Date of publication of application : 10.03.1988

(51)Int.Cl.

C12N 1/20  
 C12N 15/00  
 // C12N 9/28  
 C12P 21/00  
 (C12N 1/20  
 C12R 1:08 )

(21)Application number : 61-198120

(71)Applicant : HIGETA SHOYU KK  
 UDAKA JUZO

(22)Date of filing : 26.08.1986

(72)Inventor : UDAKA JUZO  
 TAKAGI HIROAKI  
 KADOWAKI KIYOSHI

(54) NOVEL BACILLUS BREVIS AND USE THEREOF

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain a novel Bacillus brevis useful as a host mold in gene recombination, producing a large amount of protein outside a mold but not protease outside a mold.

CONSTITUTION: A Bacillus brevis producing a large amount of protein outside a mold but not protease outside a mold. Since the novel Bacillus brevis can secrete a product by gene recombination outside a mold efficiently and does not decompose the product by gene recombination, the Bacillus brevis is extremely excellent as a host mold in gene recombination. Bacillus brevis H102 and Bacillus brevis H503 are deposited as RERM BP-1087 and FERM BP-1088, respectively, as the above-mentioned Bacillus brevis, to Fermentation Research Institute.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the  
 examiner's decision of rejection or application  
 converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of  
 rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision  
 of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

3

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-56277

⑪ Int. Cl.<sup>4</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和63年(1988)3月10日

C 12 N 1/20  
15/00  
// C 12 N 9/28  
C 12 P 21/00  
(C 12 N 1/20  
C 12 R 1:08)

6760-4B  
8412-4B  
7823-4B  
6712-4B

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 新規バチルス・ブレビス及びその利用

⑮ 特 願 昭61-198120

⑯ 出 願 昭61(1986)8月26日

⑰ 発 明 者	鵜 高 重 三	愛知県名古屋市長区植園町1番地24の3
⑱ 発 明 者	高 木 広 明	千葉県銚子市三軒町8-9
⑲ 発 明 者	門 脇 清	千葉県銚子市春日町3094-3
⑳ 出 願 人	ヒゲタ醤油株式会社	東京都中央区日本橋小網町2番3号
㉑ 出 願 人	鵜 高 重 三	愛知県名古屋市長区植園町1番地24の3
㉒ 代 理 人	弁理士 戸田 親男	

明 細 書

1. 発明の名称

新規バチルス・ブレビス及びその利用

2. 特許請求の範囲

(1) 菌体外に少量の蛋白質を生産するが、蛋白質分解酵素を菌体外に生産しないバチルス・ブレビス。

(2) 菌体外に少量の蛋白質を生産するが、蛋白質分解酵素を菌体外に生産しないバチルス・ブレビスからなる遺伝子組換えにおける宿主菌。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、新規なバチルス・ブレビス(*Bacillus brevis*)に関するものである。

更に詳細には、遺伝子組換えにおける宿主菌としての新規なバチルス・ブレビスに関するものである。

従来、一般に遺伝子組換えの微生物生産の宿主としては、大腸菌が主に使用されているが、大腸菌では、組換え遺伝子によって合成されるペプチドや蛋白質は細胞内にとどまり培地中に分泌生産

されないため、おのづとその生産量は制限され、また、細胞磨砕によりペプチド、蛋白質の抽出精製するための操作が煩雑になるなど多くの欠点が指摘されている。

鵜高は、先に、遺伝子組換えにおける宿主菌として蛋白質を菌体外に分泌する微生物を求めて研究した結果、蛋白質を多量に分泌生産する微生物として、約1200株のなかからバチルス・ブレビス4株、新菌株バチルス・プロテIFORMANS(*Bacillus proteiformans*)1株の5株を分離同定するに至った。[Agric. Biol. Chem., 40(3), 523-528(1976)]

また、一方、分泌宿主-ベクターとして枯草菌も利用され、 $\alpha$ -アミラーゼ、インターフェロンなど各種異種蛋白質を培地中に溶出させることに成功しているが、菌体内外の強いプロテアーゼにより生産量が制限されたり、分解されたりして、良好な結果は得られていない。

先に、鵜高らは、バチルス・ステアロサーモフィルス(*Bacillus stearothermophilus*) DY-5の耐

熱性 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子をプラスミドpUB110に組込んだpDAM101を保有するバチルス・プレビス47及び枯草菌を37℃48時間培養した時、バチルス・プレビス47では約15,000U/ml、枯草菌では3,000U/ml程度の $\alpha$ -アミラーゼをそれぞれ培地中に生産蓄積するのを確認した。(J. Bacteriol., 164, (3), 1182-1187(1985))

ここに、全く同一のプラスミドを保有するバチルス・プレビス47(後述)と枯草菌とでは、耐熱性 $\alpha$ -アミラーゼの生産においてバチルス・プレビス47の方が約5倍も生産効率のよいという事実から蛋白質生産菌の有する蛋白質分泌能を用いることにより異種遺伝子産物を効率良く分泌生産させることが判明した。

しかしながら、先に蛋白質を多量に菌体外に分泌生産する細菌として分離同定したバチルス・プレビス47, 144, 481, 899, バチルス・プロテイホーマンス444の5株は、いずれも培地中に牛血清アルブミン(以下BSAという。)を添加して生育させるとBSAを分解し、更にバチルス・プレビス144,

481, 899, 及びバチルス・プロテイホーマンス444の4株はカゼイン分解活性も有していることが確認された。従って、これら蛋白質を多量に菌体外に分泌生産する細菌を宿主として組換え遺伝子によって異種遺伝子産物を分泌生産させる時、効率良く分泌生産されたペプチド、蛋白質が蛋白質分解酵素によって分解されると考えられた。

そこで、本発明者らは、蛋白質を著量分泌し、かつ、蛋白質分解酵素を菌体外に全く生産しない菌株が見出されれば、遺伝子組換えにおける宿主菌としてすぐれたものであるとの発想から、このような菌株を求めて鋭意選別を行ったところ、各種試料から分離した約100,000株のなかから、菌体外に著量の蛋白質を生産するが、蛋白質分解酵素を菌体外に生産しない株を2株単離することに成功したのである。ここに単離された2株について、種の同定を行ったところ、いずれもバチルス・プレビスに属するものと同定され、本発明を完成するに至った。

本発明は、菌体外に著量の蛋白質を生産するが、

蛋白質分解酵素を菌体外に生産しないバチルス・プレビスである。

また、本発明は、菌体外に著量の蛋白質を生産するが、蛋白質分解酵素を菌体外に生産しないバチルス・プレビスからなる遺伝子組換えにおける宿主菌である。

従来、バチルス・プレビスにおいて、蛋白質を生産する菌株は知られているが、周知の菌株はすべて蛋白質分解酵素を菌体外に生産するものであって、本発明の、菌体外に著量の蛋白質を生産するが、蛋白質分解酵素を菌体外に生産しないバチルス・プレビスは全く知られておらず、新規である。

本発明においては、蛋白質を5g/l以上培地中に分泌生産しかつBSA、カゼインのいずれの蛋白質をも分解しない菌株を目標に選択分離された。

まず、土壌などの試料から分離された約100,000株の菌株をT2寒天平板培地(1%グルコース、1%ペプトン、0.5%肉エキス、0.2%酵母エキス、1.5%寒天末、pH7.0)に接種し、平板培地上でコ

ロニー周辺が5%過塩素酸に白濁する細菌を選択した。次に、ここに分離した細菌株をT2液体培地(150ml容三角フラスコ、培地量10ml)で振盪培養(30℃、48時間)し、その培養濾液中に1.2g/l以上の蛋白質を生産する菌株を80株得た。

菌体外蛋白質量の測定においては、培養液に等量の0.2N NaOHを加え攪拌後10,000rpm×5分遠心分離処理して菌体を除き、上清に等量の10%トリクロル酢酸を加えて10分後3,000rpm×10分間遠心分離して沈殿を集め、1N NaOHで溶解した後Lowry法(J. Biol. Chem. 193, 265(1951))によって定量し、蛋白質量は牛血清アルブミンとして換算した。

蛋白質高生産培地として第1表に示す培地を選んだ。

第1表 蛋白質高生産培地

組成\培地の種類	5YKC	5Y	5KC	1Y	1K
グルコース	5.0%	5.0%	5.0%	1.0%	1.0%
ポリペプトン	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
酵母エキス	0.2	0.2		0.2	
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.1		0.1		0.1
CaCl <sub>2</sub>	0.01		0.01		
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.01	0.01	0.01	0.01	0.005
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.001	0.001	0.001	0.001	0.0005
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	0.001	0.001	0.001	0.001	0.0005
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.00005
pH	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2

これらの5種類の培地のすべての培地に、先に得られた80株の菌を接種培養し、いずれかの培地で菌体外蛋白質を5g/l以上生産する菌株を31株選択した。

得られた31株について、次に示す、BSAの分解性の測定及びミルクカゼインの分解性の測定を行った。

スキムミルク5g、2g、1gを各々50ml純水に懸濁した液と寒天1gを純水50mlに溶かした液を別々にオートクレープで殺菌後両者を混合後シャーレに分注して、5%、2%、1%ミルク寒天平板培地を作った。平板培地に菌株を植菌後37℃にて3日間培養しコロニーの周りが透明になるかどうか観察した。5%、2%、1%ミルク寒天平板培地のすべてに全く透明円をつくらぬ菌株をミルクカゼインの分解性のない菌株とした。

以上の測定の結果、H102株とH503株の2株をBSA及びミルクカゼインをともに分解しないことから、蛋白質分解酵素を菌体外に生産しない菌株として選択した。また、H102株とH503株の第1表各培地での菌体外蛋白質生産量の一例を示すと第2表のようであった。

第2表 H102株、H503株の菌体外蛋白質の生産性

	生産蛋白質(g/l)				
	5YKC	5Y	5KC	1Y	1K
H102	8.1	4.1	5.3	5.7	6.9
H503	7.6	2.3	1.6	0.9	0.6

(BSAの分解性の測定)

T2培地を150ml用三角フラスコに10ml分注後オートクレープ殺菌し、無菌濾過したBSA(Sigma A4503)溶液を最終濃度3.2mg/mlになるように添加し、1晩前培養した菌株を0.2ml接種後37℃で200rpmにて振盪培養した。

培養24時間、48時間、72時間後にサンプリングした培養濾液を10,000rpm 5分間遠心分離した培養上清625μlに0.5M Tris-Cl(pH6.8)125μl、10% SDS200μl、β-メルカプトエタノール50μlを添加し攪拌後沸騰水中で3分間熱処理後0.05% BPBと70%グリセロールを含む0.0625M Tris-Cl(pH6.8)の0.1mlを加え SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)用の試料とした。スラブSDS-PAGEは10%のアクリルアミド濃度で行なった。蛋白質の検出はクーマシブリアントブルーによる染色により行った。培養24時間、48時間、72時間すべてにおいてBSAを分解しなかった菌株を、BSAの分解性のない菌株とした。

(ミルクカゼインの分解性の測定)

H102株とH503株を、Bergey's Manual Determinative Bacteriology(第8版)及び、The Prokaryote(A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria)によって同定したところ、両菌株とも、まず、好気性、グラム染色陽性、桿菌、胞子を形成する点においてバチルス属に属するものと認められ、次に、カタラーゼ陽性、V-P反応陰性、65℃での生育不能、澱粉の分解陰性、嫌気条件下での生育不能、グルコースから酸の生成(培地、12中プロテオースペプトン7g、食塩5g、グルコース5g、ブロムクレゾールパープル0.008g)陽性、7%食塩存在下で生育不能、の点において、両菌株はバチルス・プレビスに属するものと同定された。ただし、バチルス・プレビスはカゼインを分解する、とされているが、両菌株にはカゼインを分解する能力はない。

かくて、両菌株はバチルス・プレビスH102、バチルス・プレビスH503と命名された。

バチルス・プレビスH102はFERN BP-1087として

微工研に寄託され、バチルス・プレビスH503は FERM BP-1088として微工研に寄託されている。

次に、バチルス・プレビスH102及びバチルス・プレビスH503の菌学的性質を示す。

## (A)形態的性質

	バチルス・プレビス H102	バチルス・プレビス H503
細胞の大きさ	0.4~0.6×1.5~4μ	0.4~0.6×1~2μ
細胞の形	桿菌	桿菌
細胞の多形性の有無	無	無
運動性の有無	有(周毛)	有(周毛)
胞子の有無	有	有
胞子の形	長楕円形	長楕円形
胞子の形成部位	中央~末端部	中央~末端部
胞子の大きさ	0.5×1.5~2μ	0.5×1~2μ
胞子嚢の形	ふくらむ	ふくらむ
グラム染色性	陽性	陽性
抗酸性	なし	なし

## (B)各培地における生育状態

		H102	H503
肉汁寒天平板	30℃2日		
	生育状態	やや悪い	良好
	表面状態	円滑	円滑
	色	うす黄茶	うす黄茶
	光沢	光沢、半透明	やや光沢、不透明
斜面	形状	円形	円形
	隆起	扁平状~凸円状	扁平状~凸円状
	周縁	全縁	全縁
肉汁斜寒天	生育状態	中程度	中程度
	表面状態	円滑~やや粗造	円滑
	色	明るい茶灰	明るい茶灰
斜面	光沢	光沢	光沢
	形状	糸状	糸状
肉液汁体	混濁の程度	なし	大
	液面の生育沈殿	点在微量	膜状中程度
ゼラチン穿刺培養	生育	表面	表面
	液化	液化せず	液化せず
リトマスミルク	還元	せず	アルカリ
	凝固、液化	液化せず	液化せず

## (C)生理学的性質

	H102	H503
硝酸塩の還元	陰性	陰性
脱窒反応	陰性	陰性
MRテスト	陰性	陽性
VPテストアセトインの生成	陰性	陰性
インドールの生成	陰性	陰性
硫化水素の生成	陽性	陽性
澱粉の加水分解	陰性	陰性
クエン酸の利用 Koser Christensen	陽性	陽性
	陽性	陽性
無機窒素源の利用 硝酸塩 アンモニウム塩	陰性	陽性
	陽性	陽性
色素の生成(キング培地)	陰性	黄緑蛍光
ウレアーゼ	陰性	陽性
オキシダーゼ	陽性	陽性
カタラーゼ	陽性	陽性
生育できるpH (至適pH)	6-8.5 (7-8)	5-9 (6-8.5)
生育限界温度	40℃	45℃
至適温度	30-40℃	30-40℃
酸素に対する態度	好気性	好気性
O-Fテスト(hugh leifson法)	分解せず	酸化(0)
カゼインの分解	陰性	陰性
DNAの分解	陰性	陰性
NaClの耐性	2%	陰性
	5%	陰性
	7%	陰性
グルコースから酸の生成	陽性	陽性

## 炭素源の酸及びガスの生成(ー:なし)

	H102	H503
	酸	ガス
L-アラビノース	—	—
D-キシロース	—	—
D-グルコース	—	—
D-マンノース	—	—
D-フラクトース	—	—
D-ガラクトース	—	—
マルトース	—	—
シュクロース	—	—
ラクトース	—	—
トレハロース	—	—
D-ソルビット	—	—
D-マンニット	—	—
イノシット	—	—
グリセリン	—	—
デンプン	—	—

本発明の、菌体外に著量の蛋白質を生産するが、蛋白質分解酵素を菌体外に生産しないバチルス・プレビスとしてはバチルス・プレビスH102及びバチルス・プレビスH503をもって代表菌株とすることができる。

本発明の新規バチルス・プレビスを培養することにより著量生産した蛋白質の性質次第では、そ

れ自体食糧蛋白質やゲル化剤、膨化剤等の食品加工素材または、ガラス模素材、紙、人工皮革等の表面加工等の工業素材としての利用等産業上の有用性が非常に高い。

本発明の新規バチルス・プレビスは、遺伝子組換えによる生産物を効率よく菌体外に分泌することができ、そして、遺伝子組換えによる生産物を分解することがないので、遺伝子組換えにおける宿主菌としてきわめてすぐれたものである。

この系を利用して、医薬品、良質の食糧蛋白質やゲル化剤、膨化剤等の食品素材、または、ガラス模素材、紙、人工皮革等の表面加工等の工業用素材などの生産手段とすることは産業上非常に有用なものである。

以上の様に、本発明の有用性は産業上極めて意義深いものである。

次に、本発明の新規バチルス・プレビスの利用例について説明する。

#### 利用例

(好熱菌 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子の $\alpha$ -アミラーゼの大腸菌へのクロ

これらの株の保有するプラスミドを解析した結果、pHI100は6.4Kbと2.5Kbのバチルス・ステアロサーモフィラスDNA由来のHindIII断片を含み、pHI200～pHI400は同一の6.4KbのHindIII DNA断片を有していた。その制限酵素地図を第1図に示す。pHI300は6.4Kbとまだ長いDNA断片を保有しているのでプラスミドの小型化を行い3.2KbのDNA断片を含むpHI301を得た。

(好熱菌 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のサブクローニング)

枯草菌や蛋白質生産菌のようなグラム陽性菌中で $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を発現させるためにはプラスミドpUB110のようなグラム陽性菌中で複製可能なプラスミド上に $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子に移し変える必要があり、第2図に示した手順でサブクローニングを行った。pUB110上にはHindIII切断点が存在しないので、まずpUB110とpBR322の複合プラスミドを作製した後、HindIIIとBamHIで完全加水分解しアルカリ性ホスファターゼ処理を行った。一方 $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を含むpHI301はま

ーニング)

好熱菌バチルス・ステアロサーモフィラスDY-5の染色体DNAを制限酵素HindIIIで部分的に加水分解し、一方大腸菌のプラスミドベクターであるpBR322はHindIIIで完全加水分解後、アルカリ性ホスファターゼ処理を行った。両DNAを混合しT4 DNAリガーゼで連結し、大腸菌を形質転換し、アンピシリン耐性でテトラサイクリン感受性の形質転換株より $\alpha$ -アミラーゼ生産株を以下のようにして選択した。形質転換株を濾紙上にうつし、コロニー側を上にして下側からコロニーを溶菌し、次いで濾紙を1%の可溶性デンプンを含むプレート上にコロニー側を下側にしてのせ、1夜37℃で保温後、ヨードデンプン反応によりコロニーの周りに透明なゾーンを作る株を選択した。しかし活性が強い場合には形質転換株を1%可溶性デンプンを含む培地上にレプリカして、直接ヨードデンプン反応によりハローを観察することができる。

約6,000個の形質転換株より4個の $\alpha$ -アミラーゼ生産株(HI100～HI400)を分離することができた。

ずHindIIIで完全加水分解後、BamHIで部分的に加水分解した。両DNAを混合し、T4 DNAリガーゼで連結し、 $\alpha$ -アミラーゼを生産しない枯草菌(B. subtilis 1A289)をプロトプラスト法で形質転換し、カナマイシン耐性で $\alpha$ -アミラーゼを生産する株を選択した。枯草菌の $\alpha$ -アミラーゼ生産株は最初に計画した通りpHI301上の $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子を完全に含むプラスミドpBAM101を保有していた。

ついで、pBAM101を用いて $\alpha$ -アミラーゼを生産しない本発明菌株バチルス・プレビスHI02、及び蛋白質分解酵素を有し $\alpha$ -アミラーゼを生産しないバチルス・プレビス47, 899をIris-PEG法(J. Bacteriol., 156, 1130～1134(1983))で形質転換し、ネオマイシン耐性で $\alpha$ -アミラーゼ生産株を選択し、pBAM101を保有する形質転換株を分離した。

(各種宿主で生産される $\alpha$ -アミラーゼの性質)

pBAM101を保有する枯草菌(Bacillus subtilis 1A289)、蛋白質生産菌バチルス・プレビス

(*Bacillus brevis*) H102, 47及び 899の生産する $\alpha$ -アミラーゼの性質を好熱菌バチルス・ステアロサーモフィラス DY-5の生産する $\alpha$ -アミラーゼと比較した結果、すべての場合、耐熱性、好熱性ともに好熱菌の $\alpha$ -アミラーゼと同様で、 $\alpha$ -アミラーゼは80℃付近まで安定で至適温度は70°~80℃に観察された。また $\alpha$ -アミラーゼの分子量もいずれの場合も約6万でほぼ同一であった。

(各種宿主における $\alpha$ -アミラーゼの生産性)

pBAM101を保有する枯草菌 (*Bacillus subtilis* 1A289)、蛋白質生産菌バチルス・プレビス H102、47及び899を37℃で振盪培養し、経時的にサンプリングした培養液を10,000rpm×5分間遠心分離し、得た培養上清の $\alpha$ -アミラーゼ活性を測定した。 $\alpha$ -アミラーゼの測定は不破の方法に従い40℃で測定した。

5Y+ネオマイシン60 $\mu$ g/mlに48時間培養した時、枯草菌は50U/ml、蛋白質分解活性のない蛋白質生産菌バチルス・プレビスH102は約30,000U/ml、蛋白質分解活性を有するバチルス・プレビス47は

約1,300U/ml、バチルス・プレビス899は1,600U/mlの $\alpha$ -アミラーゼを培養液中に蓄積した。

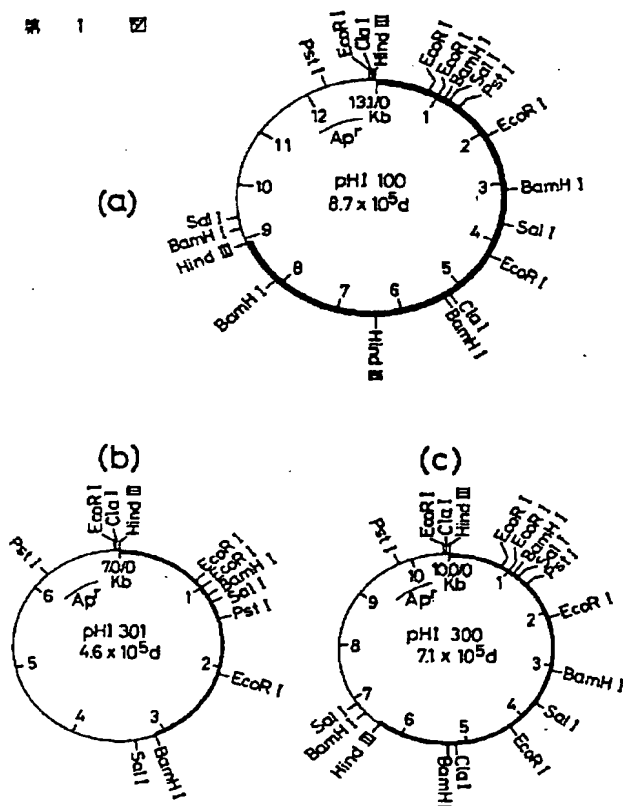
#### 4. 図面の簡単な説明

第1図 a, b, c は、それぞれpHI100, pHI301, pHI300の制限酵素地図を示す図で、太い線は*B. Stearothermophilus*由来のDNAを、細い線はpBR322 DNAを示す。Apは $\beta$ -ラクタマーゼ遺伝子の位置を示す。

第2図は $\alpha$ -アミラーゼ遺伝子のpUB110上へのサブクローニングを示す図である。

代理人 弁理士 戸 田 親 男

第 1 図



第 2 図

